



भारत का राजपत्र The Gazette of India

सी.जी.-डी.एल.-अ.-02072021-228076
CG-DL-E-02072021-228076

असाधारण
EXTRAORDINARY

भाग II—खण्ड 3—उप-खण्ड (ii)
PART II—Section 3—Sub-section (ii)

प्राधिकार से प्रकाशित
PUBLISHED BY AUTHORITY

सं. 2473]
No. 2473]

नई दिल्ली, शुक्रवार, जुलाई 2, 2021/आषाढ़ 11, 1943
NEW DELHI, FRIDAY, JULY 2, 2021/ASHADHA 11, 1943

कृषि और किसान कल्याण मंत्रालय
(कृषि, सहकारिता और किसान कल्याण विभाग)
आदेश

नई दिल्ली, 1 जुलाई, 2021

का.आ.2671(अ).—केन्द्रीय सरकार, आवश्यक वस्तु अधिनियम, 1955 (1955 का 10) की धारा 3 द्वारा प्रदत्त शक्तियों का प्रयोग करते हुए, उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) आदेश 1985 का और संशोधन के लिए निम्नलिखित आदेश करती है, अर्थात् :-

- (1) इस आदेश का संक्षिप्त नाम उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) पांचवां संशोधन आदेश 2021 है।
(2) ये राजपत्र में उनके प्रकाशन की तारीख से प्रवृत्त होंगे।
- उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) आदेश 1985, (जिसे इसमें इसके पश्चात उक्त आदेश कहों गया है) में :-
(i) खंड (2) में, उपखंड (ढुढक) में “(जैसे अरंडी या नीम) कोष्ठको और शब्दों के स्थान पर” जिसमें अरंडी, नीम, कंरज (पांगामीपिनाटा) महुआ (मधुकालेगिफोलिया) जटरोफा शामिल है को रखा जाएगा।
(ii) खंड 30 में, उपखंड (2) के स्थान पर निम्नलिखित को रखा जाएगा, अर्थात्:-
“(2) प्रयोग शाला नमूने का विश्लेषण करेगी और निम्नलिखित रिति से उपखंड (1) में निर्दिष्ट ज्ञापन में विनिर्दिष्ट प्राधिकारी को निम्नलिखित रिति से विश्लेषण रिपोर्ट भेजेगी, अर्थात्:-
(क) उर्वरक की दशा में, जैव उर्वरक, कार्बनिक उर्वरक और अखाद्य योग्य तेल रहित खली उर्वरक के सिवाय विश्लेषण रिपोर्ट प्ररूप ठ में होगी और पन्द्रह दिनों के भीतर भेजी जाएगी;
(ख) कार्बनिक उर्वरक के नमूने की दशा में विश्लेषण रिपोर्ट प्ररूप ठ1 में होगी और तीस दिनों के भीतर भेजी जाएगी;
(ग) जैव उर्वरक की दशा में विश्लेषण रिपोर्ट प्ररूप ठ2 में होगी और पैतालीस दिनों के भीतर भेजी जाएगी;

(घ) अखाद्य योग्य तेल रहित खली उर्वरक की दशा में विश्लेषण रिपोर्ट प्ररूप ठ3 में होगी और प्रयोगशाला में नमूने की प्राप्ति की तारीख से तीस दिनों के भीतर भेजी जाएगी।”;

(iii) अनुसूची III में -

(क) “[खंड (ज) और खंड (थ) देखें]” कोष्ठको, शब्दो, अंको और अक्षरो के स्थान पर “[खंड (थ) देखें] कोष्ठक, शब्द अंक और अक्षर रखे जाएंगे;

(ख) भाग क और भाग ख और उससे संबंधित प्रविष्टिया के स्थान पर निम्नलिखित भाग और प्रविष्टिया रखी जाएगी, अर्थात्:-

“भाग क

जैव उर्वरको का विनिर्देश

1. राइजोबियम

कुल व्यवहार्य संख्या	सी एफ यू चूर्ण दानेदार या वाहक सामग्री का न्यूनतम 5×10^7 कोशिका प्रति ग्राम/या कैप्सूल मात्रा आधारित जिलेटिन प्रति ग्राम अथवा तरल का 1×10^8 कोशिका प्रति मि.ली.।
संदूषण स्तर	10^5 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं
पी एच	6.5 - 7.5
क्षमता विशेषता	पैकेट पर सूचीबद्ध सभी प्रजातियों पर प्रभावी नोडूलेशन दिखना चाहिए और जब नियंत्रित परिस्थितियों के अधीन दी गई रीति के अनुसार परीक्षण किया जाए, 25 दिनों की बुवाई के पश्चात् परीक्षण पौधों में शुष्क पदार्थ में कम से कम 25 प्रतिशत वृद्धि होनी चाहिए।

2. एजोटोबैक्टर

कुल व्यवहार्य संख्या	सी एफ यू चूर्ण दानेदार या वाहक सामग्री का न्यूनतम 5×10^7 कोशिका प्रति ग्राम/या कैप्सूल मात्रा आधारित जिलेटिन प्रति ग्राम अथवा तरल का 1×10^8 कोशिका प्रति मि.ली.।
संदूषण स्तर	10^5 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं
पी एच	6.5 - 7.5
क्षमता विशेषता	किस्म में उपयोग किए गए प्राति ग्राम सुक्रोज में कम से कम 10 मि.ग्रा. नाइट्रोजन के निर्धारण की क्षमता होनी चाहिए।

3. एजोसपिरिलम

कुल व्यवहार्य संख्या	सी एफ यू चूर्ण दानेदार या वाहक सामग्री का न्यूनतम 5×10^7 कोशिका प्रति ग्राम/या कैप्सूल मात्रा आधारित जिलेटिन प्रति ग्राम अथवा तरल का 1×10^8 कोशिका प्रति मि.ली.।
संदूषण स्तर	10^5 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं
पी एच	6.5 - 7.5
क्षमता विशेषता	नाइट्रोजन मुक्त अर्ध ठोस ब्रोमोथइमोल नीले माध्यम में सफेद झिल्ली का बनना।

4. फास्फेट घुलनशील बैक्टीरिया

कुल व्यवहार्य संख्या	सी एफ यू चूर्ण दानेदार या वाहक सामग्री का न्यूनतम 5×10^7 कोशिका प्रति ग्राम या तरल का 1×10^8 कोशिका प्रति मि.ली.।
संदूषण स्तर	10^5 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं
पी एच	6.5 - 7.5 नम/शुष्क चूर्ण दानेदार वाहक आधारित और 5.0 - 7.5 तरल आधारित के लिए।
क्षमता विशेषता	जब फास्फेट स्रोत के रूप में ट्राइकैल्शियम फास्फेट या एल्यूमिनियम फॉस्फेट या आयरन फास्फेट का प्रयोग करते हुए दी गई रीति के अनुसार परीक्षण किया गया हो तब किस्म में तरल यूस फास्फोरस की कम से कम 30 मि ग्रा/ली. घुलनशील क्षमता होनी चाहिए।

5. माइकोरिजल जैव उर्वरक

उत्पाद के कुल व्यवहार्य बीजाणु/प्रति ग्राम	तैयार उत्पाद का न्यूनतम 10 व्यवहार्य बीजाणु प्रति ग्राम
पी एच	6.0 - 7.5
इनोकुलम क्षमता	10 बलव तनुकरण सहित एम.पी.एन की रीति द्वारा तैयार उत्पाद की 1200 इनोकुलम क्षमता प्रति ग्राम

6. पोटैशियम मोबिलाइजिंग जैव उर्वरक (के एम बी)

कुल व्यवहार्य संख्या	सी एफ यू चूर्ण दानेदार या वाहक सामग्री का न्यूनतम 5×10^7 कोशिका प्रति ग्राम/या कैप्सूल मात्रा आधारित जिलेटिन प्रति ग्राम अथवा तरल का 1×10^8 कोशिका प्रति मि.ली.।
संदूषण स्तर	संदूषण स्तर
पी एच	चूर्ण या दानेदार के प्ररूप में वाहक आधारित के लिए 6.5 - 7.5 और तरल आधारित या जिलेटिन आधारित में कैप्सूल के लिए 5.0 - 7.5
क्षमता विशेषता	जब स्रोत के रूप में एल्यूमिनियम पोटैशियम सिलिकेट का प्रयोग करते हुए दी गई रीति के अनुसार परीक्षण किया गया हो तब किस्म में तरलयूष में जिंक की कम से कम 20 मिग्रा/ली. घुलनशील क्षमता होनी चाहिए।

7. जिंक घुलनशील बैक्टीरिया

कुल व्यवहार्य संख्या	सी एफ यू चूर्ण दानेदार या वाहक सामग्री का न्यूनतम 5×10^7 कोशिका प्रति ग्राम/या कैप्सूल मात्रा आधारित जिलेटिन प्रति ग्राम अथवा तरल का 1×10^8 कोशिका प्रति मि.ली.।
संदूषण स्तर	10^5 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं
पी एच	चूर्ण या दानेदार के प्ररूप में वाहक आधारित के लिए 6.5 - 7.5 और तरल आधारित के लिए 5.0 - 7.5
क्षमता विशेषता	जब जिंक स्रोत के रूप में जिंक ओक्साइड/जिंक कार्बोनेट/जिंक फास्फेट का प्रयोग करते हुए दी गई रीति के अनुसार परीक्षण किया गया है तब किस्म के तरल यूष में जिंक की कम से कम 20 मिली/ली. घुलनशील क्षमता होनी चाहिए।

8. एसीटोबैक्टर

कुल व्यवहार्य संख्या	सी एफ यू चूर्ण दानेदार या वाहक सामग्री का न्यूनतम 5×10^7 कोशिका प्रति ग्राम/या कैप्सूल मात्रा आधारित जिलेटिन प्रति ग्राम अथवा तरल का 1×10^8 कोशिका प्रति मि.ली.।
संदूषण स्तर	संदूषण स्तर
पी एच	3.0 - 6.0 नम/शुष्क चूर्ण दानेदार या वाहक के लिए 5.5 - 6.0 और तरल के लिए 3.0 - 6.0
क्षमता विशेषता	अर्ध ठोस माध्यम एन सुफ्त माध्यम में पीली सी झिल्ली का सूत्रीकरण

9. वाहक आधारित संघ आधारित भागीदारी

वैयक्तिक अवयवी व्यवहार्य संख्या	निम्नलिखित सूक्ष्मजीव में से किन्ही 2 या अधिकतम तीन के मिश्रण में न्यूनतम सी एफ यू :- न्यूनतम सी एफ यू राइजोबियम या एजोबैक्टर या एजोसपिरिलम 1×10^7 प्रति ग्राम
---------------------------------	---

	न्यूनतम पी एस बी सी एफ यू 1×10^7 कोशिका प्रति ग्राम (ग्रा)
	न्यूनतम के एस बी सी एफ यू 1×10^7 कोशिका प्रति ग्राम (ग्रा)
उत्पाद के सभी जैव उर्वरक की कुल व्यवहार्य संख्या	न्यूनतम सी एफ यू बाहक/चूर्ण का 1×10^7 कोशिका प्रति ग्राम
क्षमता विशेषता	मात्रात्मक आकलन के माध्यम से वैयक्तिक जैव उर्वरक के मामले में यथा उल्लिखित विनिश्चयित किये जाने वाले वैयक्तिक सूक्ष्मजीव का दक्षता स्वरूप

10. तरल भागीदारी

वैयक्तिक अवयवी व्यवहार्य संख्या	निम्नलिखित सूक्ष्मजीव में से किन्हीं 2 या अधिकतम तीन के मिश्रण में न्यूनतम सी एफ यू :- न्यूनतम सी एफ यू राइजोवियम या एजोबैक्टर या एजोसपिरिलम 1×10^7 कोशिका प्रति ग्राम
	न्यूनतम पी एस बी सी एफ यू 5×10^7 कोशिका प्रति मि.ली. (मि.ली.)
	न्यूनतम के एस बी सी एफ यू 5×10^7 कोशिका प्रति मि.ली. (मि.ली.)
उत्पाद के सभी जैव उर्वरक की कुल व्यवहार्य संख्या	न्यूनतम सी एफ यू 1.5×10^8 कोशिका प्रति मि.ली. (मि.ली.)
पी एच	5.0-7.0
संदूषण स्तर	किसी तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं
क्षमता विशेषता	मात्रात्मक आकलन के माध्यम से वैयक्तिक जैव उर्वरक के मामले में यथा उल्लिखित विनिश्चयित किये जाने वाले वैयक्तिक सूक्ष्मजीव का दक्षता स्वरूप

11. फास्फेट घुलनशील फंगल जैव उर्वरक

बीजाणू संख्या	न्यूनतम 1×10^6 बीजाणु/ग्रा. तरल के न्यूनतम 1×10^7 व्यवहार्य फंगल बीजाणु/एम एल
संदूषण स्तर	वाहक आधारित तैयारी के लिए तरल इनोकुलम 1×10^3 कोशिका प्रति ग्राम के लिए शुन्य
पी एच	तरल - 3.5 से 5.5 वाहक - 6.0 से 7.7
क्षमता विशेषता	जब फास्फेट स्रोत के रूप में टैरिकैलशियम फास्फेट या एल्यूमिनियम फास्फेट या आयरन फास्फेट का प्रयोग करते हुए दी गई रीति के अनुसार परीक्षण किया गया है तब किस्म के तरल यूप में फास्फेट की कम से कम 30 मि.ली./ली. घुलनशील क्षमता होनी चाहिए

भाग-ख

जैव उर्वरक की सहन सीमा

1. राइजोवियम, एजोटोबैक्टर, एजोसपिरिलम फास्फेट घुलनशील बैक्टीरिया, पोटेश संग्रह बैक्टीरिया, जिंक घुलनशील बैक्टीरिया की दशा में कुल व्यवहार्य संख्या चूर्ण या दानेदार के प्ररूप में वाहक सामग्री का 1×10^7 सी एफ यू/प्रति ग्राम या तरल सूत्रीकरण के मामले में 5×10^7 सी एफ यू/प्रति एम एल से कम नहीं होगी।

2. भागीदारी की दशा में, कुल व्यवहार्य संख्या वाहक आधारित की दशा में 1×10^7 और तरल सूत्रीकरण की दशा में 1×10^8 से कम नहीं होगी।

3. माइकोरिजल जैव उर्वरक के मामले में, कुल व्यवहार्य बीजाणु पूर्ण उत्पाद के 8/प्रति ग्राम से कम नहीं होगी।”;

(ग) भाग घ में -

(I) “1क राइजोबियम जैव उर्वरक के विश्लेषण की रीति” शीर्ष के अधीन पैरा 5 में उप पैरा 3 के स्थान पर निम्नलिखित उप पैरे रखे जाएंगे, अर्थात् :-

“5.3 प्रक्रिया

5.3.1 1 मिनट तक बीजों को 70 प्रतिशत एल्कोहल में डुबोए, अल्कोहल को निकाल दे और बीजों को 3 मिनट तक ताजा तैयार किए गए 5% सोडियम हाइड्रोक्लोराइड घोल में बीज को डूबाये या पेच टोपीदार बोतल या रबड से लटकाने वाली परीक्षण नली से किसी उपयुक्त आधान में तीन मिनट तक 0.1 प्रतिशत मरक्यूरिक क्लोराइड घोल में डुबो दें। निर्जीवाणुक को निकाल दे और निर्जीवाणुक से मुक्त होने के लिए जीवाणुहीन जल से बीजों को कई बार कम से कम दस बार धोएं।

5.3.2 मिट्टी के पात्र या काचित पात्र मिट्टी 2 भाग मिट्टी और 1 भाग अपरिष्कृत रत) (पी एच 6 से 7) से भरे और 120 डिग्री सेंटीग्रेड पर 2 घंटे तक उष्मित करें, कक्ष तापमान में दो दिन के उष्मायन के पश्चात्, मिट्टी की पूर्ण निर्जीवाणुता सुनिश्चित करने के लिए उष्मित करें।

5.3.3 निर्जीवाणाकृत बीज को प्रति 50 ग्राम बीज के निर्जीवाणु जल के साथ 2 मि. ली. मिश्रित 1 ग्राम का टीका वाले कल्चर पैकेट से दिए गए टीके के गदले जले से उपचार करें टीका न लगाए गए बीज (निर्जीवाणुकृत अपनी सतत परन्तु टीके से अनुपचारित) के साथ पात्रों को एक सैट नियंत्रण के रूप में रखें। परिवर्तनो से निपटने के लिए प्रत्येक उपचार के लिए कम से कम चार या पाँच पात्र रखें।

5.3.4 परीक्षण पौधों के लिए समुचित मौसमों के दौरान उन्हें पात्र-कल्चर हाऊस में उष्मायन को नियंत्रण पात्र से टीका लगाए गए पात्र पाते को अलग करने का ध्यान रखें। बैक्टीरियल रूप से 16 घंटे के प्रकाश और 8 घंटे के अंधेरे के साथ तापमान (28 सेल्सियस); आर्द्रता (65 %) और प्रकाश तीव्रता (10 किलो लक्स) को समायोजित करने की सुविधा वाले नियंत्रित पर्यावरणीय परिस्थितियों के अधीन ग्रोथ चेंबर या ग्रोथ कैबिनेट्स में टीका लगाए गए पात्र और टीका न लगाए गए पात्र को उष्मायन करें।

5.3.5 उष्मायन के पहले दिन प्रत्येक पात्र को एक बार निष्कीटित ग्रोथ माध्यम (5.1 में यथानिर्दिष्ट) के साथ मिट्टी की नमी-धारण क्षमता तक सिंचाई करें। तत्पश्चात् बीजों को समय समय पर निष्कीटित पानी से पानी दें, टीका लगाए गए (पात्र) से टीका न लगाए गए पात्र तक पानी छिड़काव को रोकने के लिए ध्यान रखें।

5.3.6 दो सप्ताह की प्राप्ति के बाद, प्रत्येक पात्र में पौधों की संख्या को चार समान पौधों तक कम कर दें। 25 दिनों के अंत में पौधों को धीरे बहते पानी के नीचे मिट्टी से सावधानीपूर्वक अलग करें, टीका लगाए गए और टीका न लगाए गए पौधों को अलग रखें। प्रत्येक पौधे पर नोडयूल्स की संख्या को अलग अलग टीका लगाए गए और टीका न लगाए गए पात्र में रिकार्ड करें। अलग-अलग पौधों (अंकुर+जड़) को एक ओवन में 60 डिग्री सेल्सियस पर 48 घंटे के लिए अलग से सुखाए और सूखा वजन रिकार्ड करें। टीका लगाए गए और टीका न लगाए गए पौधों के औसत शुष्क वजन की गणना करें।

5.3.7 शुष्क पदार्थ की उपज में वृद्धि की गणना निम्नप्रकार है

शुष्क पदार्थ में वृद्धि प्रतिशत	डब्लू 1 - डब्लू 2	X 100
	डब्लू 2	

जहां डब्लू 1 = टीका लगाए गए पौधे के अंकुर का औसत सूखा वजन

डब्लू 2 = टीका न लगाए गए पौधे के अंकुर का औसत सूखा वजन नियंत्रण

5.3.8 यदि टीका लगाए गए पौधों में पूर्ण अनुपस्थिति या कभी 2 नियंत्रण में विचलित नॉड्यूल की उपस्थिति के साथ अच्छा नॉडयूलेशन प्राप्त होता है और यदि असंक्रामित नियंत्रण पर पौधों के शुष्क द्रव्यमान में 25% की वृद्धि होती है तो निष्कर्ष निकाला जा सकता है कि तनाव पर्याप्त रूप से नॉडयूलिंग है और प्रभावी है।”-

II 1 सी एजोसपिरिलम जैव उर्वरक के विश्लेषण की रीति शीर्ष के अधीन -

(i) पैरा 1 से पहले निम्नलिखित उप-शीर्ष अंतःस्थापित किए जाएंगे, अर्थात् :-

“कुल व्यवहार्य संख्या और पतली झिल्ली सूत्रीकरण को विनिश्चित करने की रीति”

(ii) सारणी 1 और उससे संबंधित प्रविष्टियों के पश्चात् निम्नलिखित पैरा अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात् :-

संदूषण के अवधारण की पद्धति-

मध्यम

केएच2 पी ओ 4 –	0.5 ग्राम
मिग्रा एस ओ 4.7 एच 20 –	0.2 ग्राम
एन ए सी एल 1 -	0.1 ग्राम
खमीर तत्व	0.5 ग्राम
एफ ई सी एल 13.6 एच20 –	0.15 ग्राम
डी एल-मैलिक एसिड-	4.8 ग्राम
के ओ एच –	4.8 ग्राम
*कांगो विभेदन –	15.0 मि.ली.
अपसशस्या –	20.0 ग्राम
जल -	1000 मि.ली.

*के ओ एच के 0.1 एन के साथ पी एच 7 के लिए समायोजन
1000 मि.ली. जल में 2.5 ग्राम भार कांगो लाल घोल

टिप्पण 1 ;प्लेट संगणानाओं के उष्मायन, प्लेट गणनाओं के लिए क्रमांक अवमिश्रण प्लेटों के लिए क्रमांक अवमिश्रण प्लेटों के लिए विसंक्रमण विनिर्मित की प्रक्रिया और उपनिवेशों की गणना –रिजोवियम के रूप में वहीं

टिप्पण 2 ; रोजो कांगो मध्यम एजोसपीरिलम (क. लिपोफेरम और क. ब्राजीलेंस) 1.5 से 2 मिमी व्यास) की स्थिरता शुष्क के साथ लाल कालनियों केशेस्क, गोल या अनियमित रूप उर्भिमान तीक्ष्णता और मध्य से विकिरणकारी तीक्ष्णताओं के साथ सतह भुरीक्षया के रूप में प्रतीत होता हो ।

III शीर्षक के अधीन “1.स माइकोरिजल बायोफर्टीलाइजर” के लिए विश्लेषण की पद्धति

“3. कुल जीवनश्रय बीजाणुओं का प्राक्कलन**अंतिम उत्पाद से बीजाणुओं की सस्य****अ. गीला शोषक और विस्तारण पद्धति द्वारा**

(क) उपस्कर और प्रतिकर्मक : नाइलोन या उत्पाद या नमूना से जीवनक्षय पृथक के लिए जीवनक्षय आकारों की वृहद शृंखला और नायलोन या जाली अंगरोधी इस्पात शोषकों को घेरना

- (i) सूक्ष्म आकारो जीवनक्षयों के लिए 40-50 माइक्रान (0.04 मि.मी.) शोषक
- (ii) मध्यम आकारी जीवनक्षयों के लिए 100 माइक्रान (0.14 मि.मी.) जीवनक्षम
- (iii) अधिक वृहद आकारी जीवनक्षयों और स्पोरकार्पस के लिए 250 माइक्रान (0.25 मि.मी.) जीवन क्षय
- (iv) मूल अंशाभ्यास और अन्य मलबा हटाने के लिए 450 माइक्रोन (0.45 मि.मी.) शोषक
- (v) मूल अंशाभ्यास और अन्य मलबा हटाने के लिए 1 मिलीमीटर शोषक
- (vi) प्रक्षालन बोतलें में अंतर्विष्ट जल
- (vii) शोषक संग्रहण के लिए मर्तवान
- (viii) त्रिविमदर्शी
- (ix) त्रिविमदर्शी के अधीन शीर्षक अवलोकन के लिए पैट्री तशतरियां (11 से.मी.)
- (x) चयन बीजाणु के लिए माइक्रोपेटस
- (xi) अपकेंद्रित

(ख) प्रक्रिया

जल का सारवान मात्रा में मिश्रीत 100 ग्राम माइक्रोफिजल जैव उर्वरक और जाली आकार के क्रम के अवशोषण में शोषकों की शृंखलाओं के माध्यम से निस्तारण को व्यवस्थित किया जाता है । मूलों और अपरिष्कृत शोषकों (1 मिलीमीटर और 450 माइक्रोन) पर शोषक मलबों पर संग्रहण किया जाता है जब कि धातुशोषक एक या अधिक पर बीजाणुओं को प्रगृहणित किया जाता है जल के साथ प्रबल प्रक्षालन मटियार भारिक सामग्री या कार्बनिक सामग्री के समूहों से बीजाणुओं को मुक्त होने के लिए आवश्यक है । मात्र मर्तवानों में

शोषक को संग्रहण करे। पेट्री तशतरी और स्टेरियोस्कोप के अधीन अवलोकन संग्रहित के लिए उन पर शोष को हस्तांतरण करे। प्लेट तशतरी में बीजाणुओं की संख्या में गणना करें और नमूना के बीजाणु ग्राम के रूप में इसे अभिव्यक्त करें।

(आ) सेंट्रीफुगेशन प्रवणता इक्षुशर्करा द्वारा (वैकल्पिक)

- (i) उपरोक्त वर्णित पद्धति द्वारा शोषक में संग्रहण करें। सेंट्रीफुग ट्यूब और क्षैतिज घूर्णन में 1,750 आर पी एम पर 5 मिनट के लिए उसमें बीजाणुओं को हस्तांतरण करें।
- (ii) सावधानी से पलावी द्रव को निस्तारण करें और 60% ईक्षुरा घोल में गुटिका को पुनः रोक लें। पुनः 2-5 मिनट के लिए पुनः सेंट्रीफिक करें।
- (iii) 45 माइक्रान शोषक में पलावी (बीजाणुओं के साथ) उड़ेलें और शर्करा हटाने के लिए जल साथ आधालन करें। पेट्री तशतरियां/प्लेट घर्षणित में छलनी को हस्तांतरित करें और विन्यासदर्शी के अधीन अवलोकन करें। प्लेट/ तशतरी में बीजाणुओं की संख्या की गणना करें और नमूना के बीजाणुओं की संख्या की गणना करें और नमूना के बीजाणुओं की संख्या की गणना करें और नमूना के बीजाणुओं ग्राम के रूप में इसे अभिव्यक्त करें।

3.2 बीजाणु अभिरंजन

(क) उपस्कर और अभिकर्मक

- (1) पूर्व वर्णन के अनुसार बीजाणु निष्कर्षण के लिए उपस्कर और अभिकर्मक
- (2) 2,5-डिफिनायल-2एन टेट्राजोलियम ब्रोमाइन (एम.टी.टी)
- (3) आसुत जल
- (4) ऐपिट्राफ ट्यूब
- (5) विन्यासदर्शी
- (6) पेट्री तशतरियां

(ख) प्रक्रिया

- i. एम टी टी (2,5-डाइफिनाइल- 2 एन-टेट्राजोलियम ब्रोमाइड) का 0.25 % घोल तैयार करें
- ii. प्रकाश में एम टी टी घोल के खुलाव से बचें क्योंकि अभिरंजन हलकों सूक्ष्मग्राही हैं
- iii. अभिरंजन घोल में उपर्युक्त वर्णित दो पद्धतियों में कोई द्वारा संग्रहित बीजाणुओं (संख्या में लगभग 50) के ए एम एफ ताजे संग्रहण में जोड़ें और अंधेरे में जीवाणुहीन एपेनड्रोफ ट्यूबों में 27 डिग्री सेंटीग्रेड पर उष्मायनित करें।
- iv. 24 घंटे, 48 घंटे और उष्मायन 72 घंटों के पश्चात् क्षेत्र के अंधेरे के अधीन त्रिविमदर्शी उपयोग करते हुए अभिक्रियाओं के विभिन्न रंगों के लिए बीजाणुओं का अवलोकन करें।
- v. ऐसे बीजाणु जो लाल या गुलाबी अभिरंजक हैं, निम्नलिखित फार्मूला के अनुसार जीवनक्षय है

$$\% \text{बीजाणु जीवनक्षमता} = \frac{\text{बीजाणुओं की संख्या जो लाल या गुलाबी अभिरंजक है}}{\text{कुल बीजाणुओं की संख्या}} \times 100$$

4.1 संभाव्य संरोप का निर्धारण

(क) सामग्री की आवश्यकता

- (i) अनावश्यक कागज/प्लास्टिक कप (250 मिलिलीटर) या पी.वी.सी. ट्यूब (15 से.मी. लंबा 3.2 से.मी. डायामीटर)
- (ii) प्लास्टिक थैली (30 से.मी. x 20 से.मी.)
- (iii) निर्वीजित तनुकारी (रेत: मृदा मिश्रण 1:1)
- (iv) प्याज या रागी बाजरा (रागी)

(ख) प्रक्रिया

- (i) प्लास्टिक थैली में नमूना का 30 ग्राम तौले और निर्वीजित तनुकारी (रेत: मृदा मिश्रण 1:1)। 10^{-1} तनुकारी पाने के लिए पूर्णतः हिलाएं।
- (ii) तनुकारी 10^{-1} से 30 ग्राम हटाएं और निर्वीजित तनुकारी का 270 ग्राम अंतर्विष्ट थैले अन्य दूसरे स्थान पर रखें। 10^{-2} तनुकारी पाने के लिए पूर्णतः हिलाएं। तनुकारी 10^{-4} तथा तनुकारी श्रृंखलाओं दस परत बनाएं (या उच्चतम तनुकारी यदि आवश्यक हो)
- (iii) कागज /प्लास्टिक प्याले या पी वी सी ट्यूब्स में प्रत्येक तनुकारी से व्यवकालक को वितरित करें। पांच बार दोहराकर इसका उपयोग करें।

- (iv) प्रत्येक प्याले में प्याज /रागी बाजरे के बीजों को बोएं
- (v) उभड़ने के पश्चात् प्रति ट्यूब /प्याला केवल पौधा के लिए तनु अधोवाही और पादप गृह में पौधों को बढ़ने दो या 45 दिन (कागज में/ प्लास्टिक प्याले) या 25 दिन (पी वी सी ट्यूबों में) के लिए कक्ष को प्रस्फुटित करें।
- (vi) शस्य पर व्यवकलक से मुक्त नवअंकुरों को और ट्राइपन नीले के साथ उन्हें अभिरंजन को धोएं (अभिरंजन प्रक्रिया नीचे दिया गया है)।
- (vii) सूक्ष्मदर्शी विभित्त मत के अधीन प्रत्येक दोहराने बनाने में माइक्रोफिजल की उपस्थिति या अनुपस्थिति का अवधारण करें। एम पी एन गुरुत्वाकर्षण की गणना के लिए विभिन्न तनुकरण में सकारात्मक ट्यूब (जो मायराफील में शामिल हो) की गणना करें।
- (viii) एजोसिरिविलियम जैव उर्वरकों के विश्लेषण की पद्धति के अधीन सारणी 1 5.3.3, 1 सी पर दिए गए कोहरण (195) की एम पी एन सारणियों का उपयोग करें।

टिप्पण : 1- पी वी सी ट्यूबों का उपयोग लाभकारी है क्योंकि यह वयपकालक से कम उसके साथ 25 दिन परिणाम देता है।

4.2 एम पी एन प्रकलन के लिए रीति विज्ञान और स्पष्टीकरण :

- (i) गणना में उदाहरण के लिए जो चार तनुकरणों (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} और 10^{-4}) में से प्रत्येक बार (ट्यूब) दोहराएं सकारात्मक ट्यूबों जैसे 5,5,3,2 की सम्मिश्रण की संख्या को अभिप्राप्त करें।
- (ii) यह अर्थ है कि 10^{-1} और 10^{-2} तनुकरण पर माइक्रोहिजल बनाने के लिए सभी 5 बार दोहराएं ताकि सकारात्मक हो और तनुकरण 10^{-3} पर 3 बार दोहराएं ताकि ट्यूबें सकारात्मक हो तथा तनुकरण 10^{-4} पर 2 बार दोहराएं ताकि ट्यूबें सकारात्मक हों। एम पी एम की संगणना के लिए केवल अंतिम तीन तनुकरण का सम्मिश्रण देना अपेक्षित है।
- (iii) पहली संख्या (पी 1) कम से कम तनुकरण के लिए अनुरूप हो जिसमें माइक्रोहिजल बनाने के लिए ट्यूबों (या अधिकतम संख्या सकारात्मक रहें) अगले दो तनुकरणों के लिए दो अन्य संख्याओं को (पी 2 और पी 3) जो अनुरूप रहें। उपर्युक्त उदाहरण में सम्मिश्रण पी 1 = 5, पी 2 = 3 और पी 3 = 2 होगा।
- (iv) अब कि एम पी एस सारणी में संख्याओं कतार पर पाए जिसमें पी 1 और पी 2 संख्याओं के लिए अनुरूप रहें जिसे प्रयोगात्मक अवलोकित किया है। अनुसरण करें कि पी 3 का वेल द्वारा अवलोकित द्वारा उन्मुख स्तंभ की सारणी में संख्याएं कतार के पार हो। तैयार उत्पाद नमूना में प्रतिनिधिक मूल नमूना की मात्रा में जीवियों की अधिकतम संभाव्य संख्या प्रतिच्छेदी बिंदु पर अंक अधिकतम संख्या हो।

योग आई पी /ग्राम = $\frac{\text{एम पी एन सारणी} \times \text{एम पी ए सारणी तनुकारी पी 2}}{\text{उत्पाद के शुष्क ढेर से लिया गया नमूना}}$

[उदाहरण – एम पी एन सारणी का उपयोग करें यह सकारात्मक का सम्मिश्रण 1.4 है] नमूना में एबीइक्यूटर माइक्रोहिजल फंगस (ए एम एफ) के बढ़ाने में निष्प्रभाव का एम पी अभिप्राप्त करने के लिए इस मूल्य को मध्य तनुकारी (यह 10^{-3} मामले में) द्वारा गुणित किया जाना है। इसलिए, मृदा में 1.4×10^3 संक्रामक प्रोपेग्यूल/ ग्राम नमूना (1.4×10^3 आई पी/ ग्राम या 1400 आई पी/ ग्राम) है।

4.3 उपनिवेशन माइक्रोहिजल अवलोकन के लिए मूलों का अभिरंजन

ए एम एफ द्वारा अंतःस्वचालिक कोषाणु मूल का उपनिवेशन पदरचना विज्ञान मूलरूप से बदलता नहीं है। इसलिए साफ और अभिरंजन प्रक्रिया के लिए पता लगाने और माइक्रोहिजल उपनिवेशन उपाय के अध्यधीन है।

(क) आवश्यक सामग्री

- 10% के ओ एच घोल (पोटेशियम हाइड्राक्साइड)
- 1% एच सी एल घोल (हाइड्राक्लोरिक अम्ल)
- लैक्टो ग्लिसरॉल घोल (20 मिली लैक्टिक एसिड, 40 मिली ग्लिसरॉल, 40 मिली डिस्टिल्ड वॉटर)
- लैक्टो ग्लिसरॉल घोल में 0.05% ट्रिपैन ब्लू (0.5 ग्राम/लीटर)

(ख) प्रक्रिया

1. मृदा कचरा से मूलों को साफ करें और टोटी जल के अनेक परिवर्तनों में आक्षालन करें।
2. 1 घंटे के लिए 90 डिग्री सेंटी ग्रेड या 15 मिन्ट के लिए 120 डिग्री सेंटी ग्रेड पर 10% के ओ एच में मूलों को सुखाएं।

3. के ओ एच हटाएं और के ओ एच हटाने के लिए जल (2-3 बार) के साथ मूलों को आक्षालन करें।
4. 5 मिनट के लिए 1% एच सी एल में मूलों को सुखाएं।
5. एच सी एल को हटाएं। इस कदम के पश्चात् मूल आक्षालन करें इसी तरह से समुचित अभिरंजन के लिए अम्लीकृत अवश्य होना चाहिए।
6. 1 घंटे के लिए 900 डिग्री सेंटी ग्रेड या 5 मिनट के लिए 1200 डिग्री सेंटी ग्रेड पर कर्णपटल नीला अंतर्विष्ट करके अम्लीय ग्लिकिरोल घोल में मूलों को स्टेन करें।
7. स्टेन को अलग करें और अवलोकन तक लैक्टो ग्लिसरॉल में मूलों को सुरक्षित करें।
8. मूलों को लगभग 1 से.मी. टुकड़ों में काट लें और लैक्टो ग्लिसरॉल के साथ सूक्ष्मदर्शी स्लाइडों में हथेली पर रखें, और सरका के आवरण स्थान पर रखें माइक्रोरिहिजल बनाने के लिए सूक्ष्मदर्शी के अधीन अवलोकन करें।

(IV) अनुसूची IV में -

(क) भाग क में

(अ) पैरा 1 में, कचरा मिश्रित खाद

- I मद (v) में प्रतीक और अंक <“1.0” के स्थान पर प्रतीक और अंक <“1.20”, रखा जाएगा ;
- II मद (xi) में अंकों “6.5-7.5” के स्थान पर अंकों “6.0-8.0”, रखा जाएगा ;
- III मद (xii) में अंक “4.0” के स्थान पर अंक “6.0”, रखा जाएंगे ;

(आ) पैरा 3 में

- I मद (iv) में अंक “7.9” के स्थान पर अंक “10.0”, रखे जाएंगे ;
 - II मद (vi) में अंक “10.4” के स्थान पर अंक “8.0”, रखे जाएंगे ;
 - III मद (ix) में अंक “8.2” के स्थान पर अंक “10.0”, रखे जाएंगे ;
- (इ) पैरा 4 में मद (xi) में अंक के स्थान पर “4.0” अंक “5.0”, रखे जाएंगे ;

(ख) भाग ख और इससे संबंधित प्रविष्टियों के स्थान पर निम्नलिखित भाग और प्रविष्टियां रखी जाएंगी।

“भाग ख

कार्बनिक उर्वरकों की सह्यता सीमा

कचरा मिश्रित खाद के मामले में नाइट्रोजन, फास्फोरस और पोटेशियम पोषक तत्वों का कुल योग 1 प्रतिशत से कम नहीं होना चाहिए, वर्मीकम्पोस्ट के मामले में 2.5%, जैविक खाद के मामले में 2.8% से कम नहीं होना चाहिए। पी आर ओ एम के मामले में पी2ओ5 सामग्री के संदर्भ में फॉस्फेट सामग्री 7.8% से कम नहीं होनी चाहिए।

(इ) अनुसूची (IV) में भाग घ में “कार्बनिक उर्वरकों के विश्लेषण की पद्धति” प्रपुंज घनत्व के प्रकलन क्रम संख्या

3 में “गणन” शर्षक के पैरा के स्थान पर निम्नलिखित पैरा रखा जाएगा, अर्थात्:-

“परिकलन

प्रपुंज घनत्व	नमूना का भार (डब्ल्यू 2- डब्ल्यू 1)
	मात्रा (वी 2)

जहां

डब्ल्यू 1 = 100 मिलीलीटर शुष्क सिलेंडर का भार

डब्ल्यू 2 = 100 मिलीमीटर चिन्ह तक नमूने के साथ सिलेंडर का भार

वी 1 = सघन (100 मिलीलीटर चिन्ह तक) से पूर्व सिलेंडर में नमूना की मात्रा

वी 2 = संघ के पश्चात् सिलेंडर में नमूना की मात्रा”;

(V) प्ररूप ‘ब’ में -

(क) क्रम संख्या (3) में, प्रविष्टि (iv) के पश्चात् निम्नलिखित प्रविष्टि अंतःस्थापित की जाएगी, अर्थात्:-

“(v) बैच उत्पाद अवसान की तारीख”;

(ख) क्रम संख्या 13 में, “नाम और पता” शब्दों के स्थान पर “नाम, पता और ई-मेल आई डी” अंतःस्थापित किया जाएगा।

[फा. सं. 2-5/2020 उर्व. विधि]

नीरजा अड्डिम, संयुक्त सचिव

टिप्पण : मूल आदेश सा.का.नि. 758 (अ), तारीख 25 सितंबर, 1985 द्वारा भारत के राजपत्र में प्रकाशित किया गया था और का.आ. 2333 (अ) तारीख 14 जून, 2021 द्वारा अंतिम संशोधन किए गए थे।

MINISTRY OF AGRICULTURE AND FARMERS WELFARE

(Department of Agriculture, Cooperation and Farmers Welfare)

ORDER

New Delhi, the 1st July, 2021

S.O. 2671 (E). — In exercise of the powers conferred by section 3 of the Essential Commodities Act, 1955 (10 of 1955), the Central Government hereby makes the following Order further to amend the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Order, 1985, namely:—

1. (1) This Order may be called the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Fifth Amendment Order, 2021.

(2) It shall come into force on the date of its publication in the Official Gazette.

2. In the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Order, 1985, (hereinafter referred to as the said Order),-

(i) in clause (2), in sub-clause (nna), for the brackets and words “(such as Castor, Neem)”, the words “including Castor, Neem, Karanj (Pongamiapinnata), Mahua (madhucalongifolia) and Jatropha” shall be substituted;

(ii) In clause (30), for sub-clause (2) the following shall be substituted, namely:—

“(2) The laboratory shall analyse the sample and forward the analysis report to the authority specified in the memorandum referred to in sub-clause (1) in the following manner, namely:—

(a) in case of fertiliser, other than biofertilizer, organic fertilizer and de oiled cake fertilizer, the analyzing report shall be in Form L and forwarded within fifteen days;

(b) in case of the sample of organic fertilizer, the analysis report shall be in Form L1, and forwarded within thirty days;

(c) in case of biofertilizer, the analysis report shall be in Form L2 and forwarded within forty-five days;

(d) in case of deoiled cake fertilizer, the analysis report shall be in Form L3 and forwarded within thirty days from the date of receipt of sample in the laboratory.”;

(iii) in Schedule III,-

(a) for the brackets, words, figure and letters “[See clause (h) and (q)]”, the brackets, words, figure and letters “[See clause (q)]” shall be substituted;

(b) for Part A and Part B and the entries relating thereto, the following Parts and entries shall be substituted, namely: —

“ Part A

SPECIFICATION OF BIOFERTILISER

1. Rhizobium

Total viable count	CFU minimum 5×10^7 cell per gram of powder, granules or carrier material/or per gram capsule content in gelatin base or 1×10^8 cell per ml of liquid.
--------------------	---

Contamination level	No contamination at 10^5 dilution.
pH	6.5-7.5
Efficiency character	Should show effective nodulation on all the species listed on the packet and there should be minimum of 25% increase in dry matter yield in test plant, after 25 Days After Sowing (DAS) when tested as per the method given under controlled conditions.

2. Azotobacter

Total viable count	CFU minimum 5×10^7 cell per gram of powder, granules or carrier material or per gram gelatin bases capsule content or 1×10^8 cell per milliliter (ml) of liquid.
Contamination level	No contamination at 10^5 dilution.
pH	6.5-7.5
Efficiency character	The strain should be capable of fixing at least 10 mg of nitrogen per gram of sucrose consumed.

3. Azospirillum

Total viable count	CFU minimum 5×10^7 cell per gram of powder, granules or carrier material or per gram gelatin bases capsule content or 1×10^8 cell per milliliter (ml) of liquid.
Contamination level	No contamination at 10^5 dilution.
pH	6.5-7.5
Efficiency character	Formation of white pellicle in semisolid Nitrogen free Bromothymol blue media.

4. Phosphate Solubilising Bacteria

Total viable count	CFU minimum 5×10^7 cell per gram of powder, granules or carrier material or 1×10^8 cell per milliliter (ml) of liquid.
Contamination level	No contamination at 10^5 dilution.
pH	6.5-7.5 for moist/dry powder, granulated carrier based and 5.0-7.5 for liquid based.
Efficiency character	The strain should be capable of solubilizing at least 30 mg/litre of Phosphorus in liquid broth when tested as per the method given using Tricalcium Phosphate or Aluminium Phosphate or Iron Phosphate as Phosphate source.

5. Mycorrhizal Biofertilisers

Total viable spores/gram of product	Minimum 10 viable spore per gram of finished product.
pH	6.0-7.5
Inoculum potential	1200 IP per gram of finished product by MPN method with 10 fold dilution.

6. Potassium Mobilising Biofertilisers (KMB)

Total viable Count	CFU minimum 5×10^7 cell per gram of powder, granules or carrier material or or per gram of capsule content or 1×10^8 cell per milliliter (ml) of liquid.
Contamination level	No contamination at 10^5 dilution.
pH	6.5-7.5 for carrier based in the form of powder or granules and 5.0-7.5 for liquid base or capsule in gelatin based.
Efficiency character	The strain should be capable of solubilizing at least 20 mg/litre of Potash in liquid broth when tested as per the method given using Aluminium Potassium Silicate as K source.

7. Zinc Solubilising Bacteria

Total viable count	CFU minimum 5×10^7 cell per gram of powder, granules or carrier material or per gram of capsule content 1×10^8 cell per milliliter (ml) of liquid.
Contamination level	No contamination at 10^5 dilution.
pH	6.5-7.5 for carrier based in the form of powder or granules and 5.0-7.5 for liquid base.
Efficiency character	The strain should be capable of solubilizing at least 20 mg/litre of Zinc in liquid broth when tested as per the method given using Zinc Oxide/ Zinc Carbonate/ Zinc Phosphate as Zinc source.

8. Acetobacter

Total viable count	CFU minimum 5×10^7 cell per gram of powder, granules or carrier material or per gram of capsule content 1×10^8 cell per milliliter (ml) of liquid.
Contamination level	No contamination at 10^5 dilution.
pH	5.5- 6.0 for moist /dry powder, granulated or carrier and 3.0-6.0 for liquid.
Efficiency character	Formulation of yellowish pellicle in semi solid medium N free medium.

9. Carrier Based Consortia

Individual organism viable Count	CFU minimum in a mixture of any 2 or maximum three of following micro-organisms:
	CFU minimum Rhizobium or Azotobacter or Azospirillum 1×10^7 cells per gram (g).
	CFU minimum PSB 1×10^7 cells per gram (g)
	CFU minimum KSB 1×10^7 cells per gram (g)
Total viable count of all the biofertilisers in the product	CFU minimum 3×10^7 cells per gram of carrier/powder.
Efficiency character	The efficiency character of individual microorganisms to be determined as mentioned in case of individual biofertilizers through quantitative estimation methods.

10. Liquid Consortia

Individual organism viable count	CFU minimum in a mixture of any 2 or maximum three of following microorganisms:
	CFU minimum Rhizobium or Azotobacter or Azospirillum 5×10^7 cells per milliliter (ml).
	CFU minimum PSB 5×10^7 cells per milliliter (ml).
	CFU minimum KSB 5×10^7 cells per milliliter (ml).
Total viable count of all the biofertilisers in the product	CFU minimum 1.5×10^8 cells per milliliter (ml).
pH	5.0-7.0
Contamination level	No contamination at any dilution.
Efficiency character	The efficiency character of individual microorganisms to be determined as mentioned in case of individual biofertilizers through quantitative estimation methods.

11. Phosphate Solubilising Fungal biofertilisers

Spore Count	Minimum 1×10^6 spores/gram Minimum 1×10^7 viable fungal spores/ml of the liquid.
Contamination level	Nil for liquid inoculums 1×10^3 cells per gram for carrier based preparation.
pH	Liquid: 3.5 to 5.5 Carrier: 6.0 to 7.7
Efficiency character	The strain should be capable of solubilizing at least 30 mg/litre of Phosphorus in liquid broth when tested as per the method given using Tricalcium Phosphate or Aluminium Phosphate or Iron Phosphate as Phosphate source.

Part B

TOLERANCE LIMITS OF BIOFERTILIZER

1. In case of Rhizobium, Azotobacter, Azospirillum Phosphate Solubilising Bacteria, Potash Mobilising Bacteria, Zinc Solubilising Bacteria, the total viable count shall not be less than 1×10^7 CFU/gm of carrier material in the form of powder or granules or 5×10^7 CFU/ml in case of liquid formulations.
2. In case of Consortia, the total viable count shall not be less than 1×10^7 in case of carrier based and 1×10^8 in case of liquid formulations.
3. In case of Mycorrhizal biofertilizers, total viable spores shall not be less than 8/gm of finished product.”;

(c) in part D, -

(I) under the heading “ 1 A Method of Analysis of Rhizobium biofertilisers”, in paragraph 5, for sub- paragraph 3, the following sub-paragraph shall be substituted, namely :-

“5.3 Procedure

5.3.1 Immerse the seeds in 70 percent alcohol for 1 minute, drain the alcohol and immerse the seeds in freshly prepared 5% Sodium Hypochlorite solution for 3 minutes or in 0.1 percent Mercuric Chloride solution for 3 minutes in a suitable container such as a screwcapped bottle or a test tube with a rubber bung. Drain the Sterilant and wash the seeds several times with sterile water (at least ten times) to get rid of the Sterilant.

5.3.2 Fill earthenware or glazed pot with soil (2 parts soil and 1 part washed coarse sand) (pH 6 to 7) and autoclave for 2 hours at 120°C . After two days incubation at room temperature, repeat autoclaving to ensure complete sterility of soil.

5.3.3 Treat surface sterilized seeds with water slurry of inoculant taken from a culture packet @ 1 gm inoculant mixed with 2 ml of sterile water per 50 gm seed and sow the seeds. Keep a set of pots with uninoculated seeds (surface sterilized but not treated with inoculant) as control. Keep minimum of 4-5 pots for each treatment to overcome variations.

5.3.4 Incubate them in a pot-culture house during appropriate seasons for test plants, taking care to separate the inoculated pots from the control pots. Alternatively incubate the inoculated and uninoculated pots in growth chamber/or growth cabinets under controlled environmental conditions having facilities to adjust temperature (28°C), humidity (65%) and light intensity (10 Kilo Lux) with 16 hours light and 8 hours dark period.

5.3.5 On day 1 of incubation irrigate each pot once to the moisture holding capacity of soil with sterilized growth medium (as specified at 5.1). Subsequently, water the seedling periodically with sterilized water, taking care to prevent splashing of water from inoculated pots to uninoculated ones.

5.3.6 After two weeks of growth, thin down the number of plants in each pot to four uniform plants. At the end of 25 days, separate the plants carefully from the soil under slow running water. Keep inoculated and uninoculated plants separately. Record the number of nodules on each plant, separately from inoculated and un-inoculated pots. Dry the individual plants (shoot + root) in an oven at 60°C for 48 hours, separately and record dry weight. Calculate average dry weight of inoculated and un-inoculated plants.

5.3.7 Calculate the increase in dry matter yield as under

% increase in dry matter =	W1 – W2	x 100
	W2	

Where W1 = average dry weight of inoculated plant shoot

W2 = average dry weight of control un-inoculated plant shoot.

5.3.8 If good nodulation is obtained in inoculated plants together with total absence or sometimes presence of stray nodules in controls and if there is a 25% percent increase in the dry mass of plants over the uninoculated control, it may be concluded that the strain is adequately nodulating and is effective.”;

II. Under the heading” 1C Method of Analysis of Azospirillum biofertilizers,”-

(i) before paragraph 1, the following sub-heading shall be inserted, namely:-

“Method of determination of total viable count and Pellicle formation”

(ii) after Table 1 and entries relating thereto, the following paragraph, shall be inserted, namely:-

B. Method of determination of Contamination

Medium

KH ₂ PO ₄	0.5gram
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gram
NaCl	0.1 gram
Yeast Extract	0.5 gram
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.015 gram
DL-malic acid	5.0 gram
KOH	4.8 gram
*Congo resolution	15.0 ml
Agar	20.0 gram
Water	~1000 ml

Adjust to pH 7 with 0.1N of KOH

*Congo red solution weigh 2.5 g in 1000 ml water

Note 1:- Sterilizing and preparation procedure for plates, serial dilution for plate counts, incubation of plates and counting of colonies – Same as of Rhizobium.

Note 2:- On Rojo Congo medium, Azospirillum (*A. lipoferum* and *A. brasilense*) colonies shall appear as scarlet red colonies with dry consistency, diameter of 1.5 to 2 mm, round or irregular form, undulate edge, and rugose surface with ridges radiating from the center.

III. Under the heading “1. E. Method of analysis for Mycorrhizal Biofertilisers”, for paragraphs 3 and 4, the following paragraphs shall be substituted, namely:-

“3. Estimation of total viable spores

Harvesting of spores from finished product

A. By wet sieving and decantation method

(a) Equipment and Reagent: Stalking sieves with nylon or stainless steel mesh and a large range of pore sizes for isolating spores from the product or sample

- (i) 40-50 micron (0.04 mm) sieve for small sized spores.
- (ii) 100 micron (0.14 mm) sieve for medium sized spores.
- (iii) 250 micron (0.25 mm) sieve for very large sized spores and sporocarps.
- (iv) 450 micron (0.45 mm) sieve for removing root bits and other debris.
- (v) 1 mm sieve for removing root bits and other debris.
- (vi) Wash bottles containing water.
- (vii) Jars for collecting the sieving.
- (viii) Stereomicroscope
- (ix) Petri dishes (11 cm) for observing the sieving under stereomicroscope
- (x) Micropipettes for spore picking.
- (xi) Centrifuge

(b) Procedure

Mix 100 gram Mycorrhizal biofertiliser in a substantial volume of water and decant through a series of sieves arranged in descending order of mesh size. Roots and coarse debris are collected on coarse sieves (1mm and 450 micron), while spores are captured on one or more finer sieves. Vigorous washing with water is necessary to free spores from aggregates of clay carrier material or organic materials. Collect the sieving in jars. Transfer the sieving on to the gridded Petri dishes/plate and observe under stereomicroscope. Count the number of spores in plate/dish and express it as spores/gram of the sample.

(B) By Sucrose gradient centrifugation (optional)

- (i) Collect the sieving by the method described above. Transfer the sieving into centrifuge tubes and centrifuge for 5 minutes at 1,750 rpm in a horizontal rotor.
- (ii) Decant the supernatant liquid carefully and resuspend pellet in 60% sucrose solution. Again centrifuge for 2-5 minutes.
- (iii) Pour the supernatant (with spores) onto a 45 micron sieve and rinse with water to remove the sugar. Transfer the sieving onto the gridded Petri dishes/ plate and observe under stereomicroscope. Count the number of spores in plate/ dish and express it as spores/gram of the sample.

3.2 Spore staining

(a) Equipment and Reagent

- (1) Equipment and reagents for spore extraction as described previously
- (2) 2,5-diphenyl-2N-tetrazolium bromide (MTT)
- (3) Distilled water
- (4) Eppendorf tubes
- (5) Stereomicroscope
- (6) Petri dishes

(b) Procedure

- (i) Prepare 0.25% solution of MTT (2,5-diphenyl-2N-tetrazolium bromide)
- (ii) Avoid exposure of MTT solution to light, as the stain is light sensitive
- (iii) Add freshly collect AMF spores (approximately 50 in number) collected by any of the two methods described above to the staining solution and incubate at 27°C in sterile Eppendorf tubes in dark
- (iv) Observe the spores for different colour reactions using stereomicroscope under dark field after 24 hours, 48 hours and 72 hours of incubation.
- (v) Spores, which stained red or pink, are treated as viable, as per the following formula:

$$\% \text{ Spore viability} = \frac{\text{Number of spores which stained red or pink}}{\text{Total number of spores}} \times 100$$

4.1 Assessment of Inoculum Potential

(a) Materials needed:

- i. Disposable paper/ plastic cups (250 ml) or PVC tubes (15 cm long; 3.2 cm dia.)
- ii. Plastic bags (30 cm x 20 cm)
- iii. Sterilized diluents (sand: soil mix 1:1)
- iv. Onion or Finger millet (ragi) seeds

(b) Procedure:

- (i) Weigh 30 gram of sample in a plastic bag and add to it 270 gram of sterilized diluents (sand: soil mix 1:1). Shake thoroughly to get 10^{-1} dilution.
- (ii) Remove 30 gram from the 10^{-1} dilution and place it into another bag containing 270 g of sterilized diluents. Shake thoroughly to get 10^{-2} dilution. Make a tenfold series dilution up to 10^{-4} dilution. (or higher dilution if needed).
- (iii) Distribute substrate from each dilution into paper/ plastic cups or PVC tubes. Use five replicate cups/ tubes per dilution.
- (iv) Sow seeds of onion/ Finger millet into each cup.
- (v) After emergence, thin down to only one plant per tube/cup and let plants grow in a green house or growth room for 45 days (in paper/ plastic cups) or 25 days (in PVC tubes).
- (vi) At harvest, wash roots free from substrate and stain them with Trypan blue (see the staining procedure given below).
- (vii) Under a dissecting microscope, determine presence or absence of mycorrhizal colonization in each replicate. Counts of positive tube (those containing mycorrhizae) in different dilutions are used to calculate MPN values.
- (viii) Use MPN tables of Cochran (1950) given at 1C, 5.3.3 Table 1 under Method of Analysis of Azospirillum Biofertilizers.

Note: Using PVC tubes is advantageous as it gives the result in 25 days with less substrate.

4.2 Methodology and explanation for estimating MPN:

- (i) To exemplify the calculation, let's consider that in the 5 replicates (tubes) in each of the four dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}), one obtains a combination of number of positive tubes like: 5,5,3,2;
- (ii) This means that all 5 replicate tubes are positive for mycorrhizal colonization at 10^{-1} and 10^{-2} dilution, 3 replicate tubes are positive at 10^{-3} dilution and 2 replicate tubes are positive at 10^{-4} dilution. For the calculation of MPN, only last three dilutions of a given combination are required;
- (iii) The first number (P1) corresponds to the least dilution in which all (or the highest number of) tubes are positive for mycorrhizal colonization. The two other numbers (P2 and P3) are those corresponding to the next two dilutions. In the example above, the combination would be: P1=5, P2=3 and P3=2;
- (iv) Now find the row of numbers in MPN Table in which P1 and P2 correspond to the numbers observed experimentally. Follow that row of numbers across the table to the column headed by the observed value of P3. The figure at the point of intersection is the most probable number of organisms in the quantity of original sample represented in the finished product sample. Calculate total IP/gm as follows:-

Total IP/gm =	$\frac{\text{Value from MPN Table} \times \text{Dilution level of P2}}{\text{Dry mass of product sample taken}}$
---------------	--

[Example - Using the MPN table, the value given for this combination of positive values is 1.4. To obtain the MPN of infective propagules of Arbuscular Mycorrhizal Fungus (AMF) in the sample, this value has to be multiplied by the middle dilution (in this case 10^{-3}). Therefore, the soil has 1.4×10^3 infective propagules/g sample (1.4×10^3 IP/g or say 1400 IP/g)].

4.3. Staining roots to observe Mycorrhizal colonization

Colonization of root cortex cells by Arbuscular Mycorrhizal Fungus does not alter root morphology. Therefore, to detect and measure mycorrhizal colonization, roots are subjected to a clearing and staining procedure.

(a) Materials needed:

- (i) 10% KOH solution (Potassium Hydroxide)
- (ii) 1% HCl solution (Hydrochloric acid)
- (iii) Lacto Glycerol solution (20 ml Lactic acid, 40 ml Glycerol, 40 ml distilled water)
- (iv) 0.05% Trypan Blue in Lacto Glycerol solution (0.5g/L)

(b) Procedure:

1. Wash roots free from soil debris and rinse in several changes of tap water.
2. Soak roots in 10% KOH at 90°C for 1 hour or at 120°C for 15 minutes.
3. Remove KOH and rinse roots with water (2-3 times) to remove KOH
4. Soak roots in 1% HCl solution for 5 minutes.
5. Remove HCl. Do not rinse roots after this step as they must be acidified for proper staining.
6. Stain roots in acidic glycerol solution containing Trypan blue at 90°C for 1 hour or at 120°C for 5 minutes.
7. Discard stain and keep roots in lacto glycerol till observation.
8. Cut the root into about 1 cm pieces and mount in microscopic slides with Lactoglycerol, place cover slip and observe under the microscope for mycorrhizal colonization.

(iv). in schedule IV,-

(a) in Part A,-

(A) in paragraph 1" City compost",-

- I. in item (v), for the symbol and figure "<1.0", the symbol and figure "< 1.20", shall be substituted;
- II. in item (xi), for the figures "6.5- 7.5", the figures "6.0 -8.0" shall be substituted;
- III. in item (xii), for the figure "4.0", the figure "6.0", shall be substituted;

(B) in paragraph 3,-

- I. in item (iv) , for the figure "7.9", the figure "10.0", shall be substituted;
- II. in item (vi) , for the figure "10.4", the figure "8.0", shall be substituted;
- III. in item (ix) , for the figure "8.2", the figure "10.0", shall be substituted;

(C) in paragraph 4, in item (xi), for the figure "4.0", the figure "5.0", shall be substituted.

(b) for Part B and the entries relating thereto, the following Part and entries shall be substituted, namely:—

"Part B

TOLERANCE LIMIT OF ORGANIC FERTILIZERS

A sum total of Nitrogen, Phosphorus and Potassium nutrients shall not be less than 1 per cent. in case of City Compost, 2.5 % in case of Vermicompost, 2.8% in case of organic manure. In case of PROM the Phosphate content in terms of P₂O₅ content shall not be less than 7.8%."

(c) In Schedule IV, in Part D "METHODS OF ANALYSIS OF ORGANIC FERTILIZERS", in serial 3. "Estimation of Bulk Density", for paragraph with heading 'Calculation', the following paragraph shall be substituted, namely:—

"Calculation:

Bulk Density =	Weight of sample (W2-W1)
	Volume (V2)

Where

W1 = Weight of 100 ml dry cylinder

W2 = Weight of the cylinder along with the sample upto 100 ml mark

V1 = Volume of sample in cylinder before compacting (up to 100 ml mark)

V2 = Volume of sample in cylinder after compacting.”;

(V). in Form ‘J’,-

(a) in serial number (3), after entry (iv) , the following entry shall be inserted namely:—

“(v) the date of expiry of the batch product”;

(b) in serial number 13, for the words “Name and Address”, the words “Name, Address and e-mail ID” shall be inserted.

[F.No.2-5/2020 Fert.Law]

NEERAJA ADDIDAM, Jt. Secy.

Note: The principal order was published in the Gazette of India *vide* GSR number 758(E), dated the 25th September, 1985 and was last amended *vide*. number S.O 2333 (E) dated 14th June, 2021